

201428002A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の

発達期影響予測法に関する研究

(H24-化学-一般-002)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 27 (2015) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の

発達期影響予測法に関する研究

(H24-化学-一般-002)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 27 (2015) 年 4 月

目次

I 総括研究報告書

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の発達期影響予測法に関する研究
..... 1

研究代表者 大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授

II 分担研究報告書

1. ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に
関する検討
..... 8

曾根 秀子 国立環境研究所 室長

2. TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立
の試み
..... 15

大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授

3. ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究
..... 19

藤渕 航 京都大学 iPS 細胞研究所 教授

III 研究成果の刊行に関する一覧表

.....

IV 研究成果の刊行物・別刷

.....

総括研究報告書

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の発達期影響予測法に関する研究

研究代表者
大迫 誠一郎
東京大学 准教授

研究要旨

ヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞など）を利用した臨床応用にはまだ多くの技術上の課題があるが、創薬や毒性試験へは早期に応用できると考えられている。多能性幹細胞の利点は生体内の発生過程を再現できる点であり、化学物質のヒトへの発達毒性試験にヒト ES/iPS 細胞を用いた分化培養系の有効性が期待されている。しかしながら、ヒト多能性幹細胞を用いた分化培養系は簡便性向上という点から、遺伝子導入や培養技術など、さらなる開発研究が必要である。本研究では、複数の標的組織細胞の分化影響を簡便にモニタリングし、上記の評価手法に応用できる細胞開発の目的のために、神経系細胞の分化培養に加えて、使用するヒト ES/iPS 細胞を遺伝子改変でハイスループットイメージング用に加工し、複数のドナー株ならびに系統株を同一線上に配置した曝露試験「ヒト多能性幹細胞試験バッテリー」構築を目的とした。

サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

ヒト H9 株（ヒト ES 細胞由来）の神経前駆細胞（hPNC）を用い、三次元培養によるニューロスフィアを形成させ、ハイスループットアッセイに最適化した短期ニューロスフィアアッセイの条件を検討した。影響評価の検討には、Benzo[a]pyrene（BaP）及び 5-Aza-2'-deoxycytidine（5-Azadc）の 2 種類の化学物質を使用、用量反応関係を調べたところ、10 日間で多検体も同時に可能なアッセイ条件を見出し、化学物質の影響を定量的に把握することができることがわかった。

サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

ヒト ES 細胞に Transcription activator-like effector nuclease（TALEN）を用いたゲノム編集手法により、ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase（TH）遺伝子のエクソン 1 下流に EGFP を挿入した細胞を作出を試みた。TH のエクソン 1 直後領域を特異的に切断する TALEN 左右側ベクター（Sigma 社）および切断領域と相補的配列を両端に持つ 5'TH-EGFP-neo-3' を作成した。KhES1 にリポフェクションによる導入後、G418 によるセレクションを行い、10 日目に生存しているコロニーをピックアップしてクローン化しゲノム DNA を抽出した。PCR による TH 遺伝子への編集をチェックしたが、目的のサイズに PCR 産物

が確認できるものの、陰性対象である野生型 KhES1 にも同様なバンドが確認されたことから、ゲノム編集は期待通りに起きていないことがわかった。

サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験を実現化する上で、将来的に大きな壁となると考えられる種々の解析法に関して検討した。具体的には1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法、及び、2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法について研究を行った。これらの基礎技術は次世代の高性能な大規模ヒト幹細胞毒性試験システムを構築するために大変重要な構成要素であり、特に従来の遺伝子ネットワーク解析で課題となっていた実験データ数を軽減可能であることが示唆された。

共同研究者

サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

- 曾根 秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長
- 南斎 ひろ子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 技術員

サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

- 大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授
- 甲田 雅伸 東京大学 疾患生命工学センター 技術員

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

- 藤渕 航 京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 教授
- 山根 順子 京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 研究員

A. 研究目的

ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞など) を利用した

応用研究は、山中教授のノーベル賞受賞を機に我が国が重点的に推進すべき科学技術分野となった。神経系細胞等の分化細胞を移植する臨床応用には多くの技術上の課題があるが、創薬や毒性試験への応用は早期に実現できるものとして期待されている。

多能性幹細胞の利点は発生の極めて初期の生体内の発生過程を再現できる点にある。化学物質のヒトへの発達毒性試験では、ヒトに近い高等な霊長類を用いた実験が必要だがコスト面で実施困難な場合が多い。したがって、ヒト ES/iPS 細胞を用いた分化培養系を応用したソリューションが期待されているがヒト ES/iPS 細胞を用いた EST で実効性の高い評価系の報告は少ないのが現状である。

我々は、平成 21~23 年度の厚生労働科学研究費でヒト ES 細胞を利用した EST による化学物質の影響評価法開発として「確率推論型アルゴリズムへのヒト胚性幹細胞試験データ適用方法の標準化に関する研究」を実施し、(1) ベイジアンネットワーク解析を用いたメチル水銀に対する発達神経分化影響 (He et al., *Toxicol Lett.*, 2012)、(2) 複数の化学物質を用いたヒト ES 細胞の発達毒性のベイズ推定を融合したサポートベクターマシンによる影響判別、(3) 分化初期の化学物質曝露による遺伝子変動情報と後の形態情報との関連性を評価するための、確率推論モデルを用いたマルチパラメトリックブ

ロファイリングネットワーク（Multi-parametric profiling network）という新しい概念を確立した（Nagano et al., *Int J Mol Sci.*, 2012）。

なお、ベイジアンネットワーク解析を用いたメチル水銀に対する発達神経分化影響の新しい評価法（He et al., *Toxicol Lett.*, 2012）では、ヒトの発達途上の神経細胞のほうがマウスのそれよりメチル水銀に対する後発的影響が出やすいこと見出し、動物実験では検出できないヒトへの影響を予測できる可能性を示した。東京大学と国立環境研究所の共同プレスリリースを行い、日刊工業新聞、日経電子版等、いくつかの報道機関により報道された。

本研究では、複数の標的組織細胞の分化影響を簡便にモニタリングし、上記の評価手法に応用できる細胞の開発を行うことを目的としている。すでに確立されているヒト多能性幹細胞を用いた神経系細胞の分化培養に加えて、肝細胞分化培養系を新たに導入し、同一環境、同一曝露系による比較解析を行う。使用する全てのヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞を遺伝子改変でハイスループットイメージング用に加工し、複数のドナー株ならびに系統株を同一線上に配置した曝露試験を行う。予測法としては確率推論を融合したサポートベクター回帰法を適応し、これにより「ヒト多能性幹細胞試験バッテリー」を構築する。

B. 研究方法

サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

ヒト胚性幹細胞（H9 細胞）由来神経前駆細胞株を米 EMD Millipore 社から購入し以下の実験を行った。

1) 神経系細胞分化マーカーの遺伝子導入

ヒト MAP2 遺伝子調節領域として報告されている、ゲノム領域を組み込んだ pGL3-Metluc-copGFP-Neo プラスミドを遺伝子導入した hMAP2-Metluc-copGFP-hNPC 細胞（平成 24 年度作成）、およびド

ーパミンニューロンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域を組み込んだ TH-pEGFP プラスミドを導入した hsTH-pEGFP-hNPC 細胞（平成 25 年度作成）の増殖・分化培養実験を行った。

2) ニューロスフィアアッセイに関する検討

正常 hNPC 細胞を用いて「ニューロスフィアアッセイ」の最適化試験を実施した。丸底 96 ウェルプレート（Nunc-Falcon）の 1 ウェルあたり、3000～6000 個細胞を播種、5～7 日間培養し、平面底の 24 ウェルプレートもしくは 48 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 1 個のスフィアになるように再播種し、神経分化専用培地で 5～7 日間さらに培養した。免疫染色で MAP2 をラベルしマルチチャンネル自動画像解析装置（INCell-Analyzer 1000）により、神経突起伸長を定量化した。さらに、スフィア自体の形態計測のため Image J で面積を定量した。また、アッセイの評価のため、Benzo[a]pyrene (BaP) 及び 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) を培地中に添加した。

サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

TH のエクソン 1 直後領域を特異的に切断する TALEN 左右側ベクター（PTAL-R および PTAL-L）を準備し、PTAL-R および PTAL-L から mRNA に変換し、ドナー DNA として TH-pEGFP DNA と共にヒト ES 細胞（KhES1）へ同時に遺伝子導入した。リポフェクションにより遺伝子導入、G418 によるセレクションを行い、10 日目に生存しているコロニーをピックアップしてクローン化した。レポーター遺伝子の導入を確認するため、PCR により検討した。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法の検討

近年、特に毒性物質がエピゲノム状態の変化をもたらすことが報告されるようになり、化合物毒性試験技術の高度化にメチロームによる測定も重要視されている。より多種類の ES/iPS 細胞を、同一環境、同一曝露系による一連の毒性試験を実現するには、シングルセルレベルでのメチローム解析が重要である。しかしながら、世界的にも技術基盤はまだ確立されていない。昨年度より、バイサルファイトロスを軽減する手法を設計し、従来、捨てられてしまう核酸配列の再利用に取り組んだ。

2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法の開発

RT-PCR やマイクロアレイ等遺伝子発現データを用いた遺伝子ネットワークを推定し、これを用いて毒性予測を行うことは従来に比べて予測の高性能化をもたらすことが我々の研究で確かめられたが、遺伝子ネットワークの推定には大量の実験データを必要とし、毒性試験システムの大規模化に大きな障壁となっていた。このため、各種細胞毎で得られた実験データが希少であっても、全細胞種では相当なデータ数が得られることを利用してコンセンサスネットワークを生成し、そこから逆に解析したい細胞種を除去することで生じる遺伝子ネットワークへの影響を測定する「サブトラクティブネットワーク」の手法を開発した。

(倫理面への配慮)

共同研究機関である国立環境研究所は、2008年10月11日付で文部科学省ヒト ES 細胞使用実験倫理審査委員会から研究実施が認可されている。また、研究代表者大迫も東京大学ライフサイエンス委員会倫理審査専門委員会で2009年12月機関承認、2010年1月文部科学省より使用許可を得た。京都大学医学研究科では「医の倫理委員会」を通してその倫理面の審査を行っている。共同研究者から得られる遺伝子発現データの情報解析については、倫理委員会で承認の必要がないと判断され、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

1) 神経系細胞分化マーカーの遺伝子導入

hMAP2-Metluc-copGFP-hNPC 細胞の増殖及び分化培養を行ったが、神経分化の様子を MAP2 抗体による蛍光免疫化学染色で観察することは出来るものの、copGFP 蛍光は非常に微弱でアッセイに十分な蛍光強度は得られなかった。また、hsTH-pEGFP-hNPC 細胞の増殖・分化培養を行い、神経分化の様子を TH 特異抗体による蛍光免疫化学染色で行ったところ、EGFP の蛍光が TH とマージすることが確認できた。しかし、EGFP 蛍光は分化とともに減少し非常に微弱でアッセイに十分な蛍光強度は得られなかった。

2) ニューロスフィアアッセイに関する検討

我々の先行研究において二次元の培養ではあるが、ラミニン 511 (LN511) が従来のポリオルニチン-ラミニン (PL-O-LN111) より神経分化が適当であることを見出し、これを使用してきたが、3次元培養のスフィアアッセイにおいても同様であるかどうかを4種の細胞外マトリックス蛋白質のコートプレートを作成して検討した。その結果、LN511 が含有されているコートプレートでは、十分に神経突起が伸展し、更に、固定→洗浄→免疫染色という多段階の行程を経ても型崩れしなかった。しかし、細胞あたりの神経突起伸長とスフィアコアから外側への遊走はポリオルニチン-ラミニン 111+ラミニン 511 (PL-O-LN111+LN511) が最も大きかった。ニューロスフィアに最適な1ウェルあたりの細胞数では、3000個と6000個で検討したが、6000個のほうが再現性、均一性が高かった。また、スフィア形成と分化期間の長さに関する検討では、スフィア形成期間が長いほど、分化培地に移した後の細胞遊走能は高いことがわかったが、一方で細胞遊走能が

高すぎると、解析のための細胞固定→免疫染色の行程には再現性が悪く、結果的にスフィア形成期間を5日間と、分化期間を5日間ないし6日間とする計10-11日間のアッセイを確立した。さらに、BaP及び5-Azadcのそれぞれ、3用量をスフィア形成2日後に添加し3日間培養し、その後、化学物質のない分化培地で培養し、影響を調べたところ、両物質とも、量依存的にスフィアコアからの神経細胞の遊走を抑制し、コアの増殖も抑制されることが観察された。

サブテーマ2) TALENを用いたTH陽性細胞を検出するEGFPレポーター導入ヒトES細胞株樹立の試み

トランスフェクション後のG418を用いたセレクションにより最終的に15クローンのG418耐性株が得られた。Nested PCRを実施したが、すべてのクローンにおいて予想されるサイズにアンプリコンは確認できなかった。

サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法の検討

ES細胞株、iPS細胞株、MSC等を用いたマルチプレックスシングルセルメチローム法のプロトコル設計に取り組んだ。本プロトコルは、未だに関連する決定的な論文がなく独自に開発する必要があり、発表済みの「シングルセルメチローム解析」及びバイサルファイト処理とフラグメント化の順番を入れ替えた「RRBS法」と「PBAT法」を基軸としてプロトコルの設計を行った。また、本手法により、従来のRRBS法でバイサルファイト時に損失のあった核酸配列を回収できる系の確立を試みた。収量獲得を高くするためのビーズ精製法を、バイサルファイト処理後のロス軽減を目指し特殊な酵素を用い検討を重ね、レスキューを行わない場合と比べ回収率の上昇が認められた。

2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワ

ーク推定法の開発

現在マルチプレックスシングルセルRNA-seqでは一度に8種の細胞からそれぞれ12データずつ、計96データの取得が可能である。従来のベイジアンネットワーク推定では、1種の細胞で12/4=3遺伝子程度でのネットワークしか推定が可能でなかった。今回、全96データから、96/4=24であるため、26の幹細胞維持や分化に必要な遺伝子について「コンセンサスネットワーク」推定を行った。さらに、そこから脂肪細胞12データを削除した場合の「サブトラクティブネットワーク」推定を行った。

D. 考察

サブテーマ1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質であるMap2もしくはドーパミン神経特異的マーカーであるTH遺伝子に緑色蛍光タンパク質EGFP遺伝子を結合したりポーター遺伝子をhNPCに組み込んだが、両遺伝子ともハイスループットアッセイに耐えうる安定株は樹立できない結果となった。今後ヒト細胞で導入実績のあるDNA配列に切り替える必要があると考えられる。

一方で、遺伝子改変のないhNPCを用いてニューロスフィアアッセイの確立を試みた。ハイスループット化には、再現性と定量性が求められる。そのため、1ウェル1スフィアでアッセイすることを考案した。96ウェルプレートでスフィアを作成し、ウェルの中心にスフィアを置いて、顕微鏡観察を行うためには、96ウェルプレートよりも、48ウェルプレートの方が再現性よく、スフィアをおくことができ、また定量性もあるため、後者で化学物質の影響を評価した。しかし今後、ロボットアッセイ機器の導入が可能になれば、384ウェルレベルまで解析が可能になるものと考えられた。

サブテーマ2) TALENを用いたTH陽性細胞を検出

する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

今回 TALEN を用いて実施した KhES1 細胞へのレポーター遺伝子の編集は確認できなかった。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

シングルセルメチロームについては現時点ではまだマルチプレックスに対応出来る系は確立されておらず、また、ゲノムを対象とするため、バイサルファイト処理を行うことで生じる核酸配列の損失をいかに回復させられるかということが大きな課題となる。今年度行ったマルチプレックスシングルセルメチローム解析のプロトコルは、ある程度再現性良く回収出来る系が確立されることが示唆され、今後更にこの技術を用いて細胞を対象とした重要な知見が得られると期待させる結果が得られた。

毒性試験において、従来、各化合物について遺伝子数の約 4 倍の実験データが必要であったが、この手法を用いると実験データが化合物の数だけ倍増するという利点がある。例えば、20 化合物でそれぞれ 40 データしかない場合、これまで各化合物で 10 遺伝子しかネットワーク推定ができなかったが、本手法を用いると 200 遺伝子のコンセンサスネットワークを推定でき、1 化合物を除去した場合 190 遺伝子のネットワークとなる。おそらく 100 遺伝子もあれば詳細な推定が可能であると考えられるため、半分の 20 データでも可能であり、マイクロアレイに換算すると、20 化合物×20 データ=400 枚程度で十分テスト予測系の構築が可能であると示唆された。

E. 結論

サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性幹細胞由来神経分化細胞を構築するために、二種の神経細胞特異的遺伝子プロモーターを用いた

が、分化後に十分な強さの蛍光を持つ細胞は樹立できなかった。今後、更なる導入技術の改善やマーカー遺伝子の変更が必要と考えられた。また、非遺伝子改変 hNPC を用いた短期のニューロスフィアアッセイを確立し、化学物質曝露による評価を行い、アッセイの有用性を提示した。

サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

TALEN を用いたヒト ES 細胞への遺伝子編集は前年のヒト神経幹細胞を用いたい場合の結果と同じであり、今回の戦略では極めて困難であることがわかった。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における測定の標準化に関する研究

昨年度の報告書で重要と判明したシングルセルメチローム解析法のプロトコルの開発で、最も核心となる核酸配列の回収を可能とした。また、希少データでも ES/iPS 細胞を一度に遺伝子ネットワーク推定するサブトラクティブネットワーク手法の有効性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

大迫誠一郎：研究代表者

1. Aida-Yasuoka K, Yoshioka W, Kawaguchi T, **Ohshako S**, Tohyama C. A mouse strain less responsive to dioxin-induced prostaglandin E2 synthesis is resistant to the onset of neonatal hydronephrosis. *Toxicol Sci*, 141(2), 465-474, (2014).
2. Shiizaki K, **Ohshako S**, Kawanishi M, and Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole:

- possible determinants for binding putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol*, 85(2), 279-289, (2014).
3. Alam MS, **Ohsako S**, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemical*, 116(3), 474-480, (2014).
 4. Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, **Ohsako S**, and Tohyama C. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *J Applied Toxicol*, 34(3), 296-306, (2014).
 2. Wong PS, Tanaka M, Sunaga Y, Tanaka M, Taniguchi T, Yoshino T, Tanaka T, **Fujibuchi W**, Aburatani S. Tracking difference in gene expression in a time-course experiment using gene set enrichment analysis, *PLoS One*, 9(9): e107629 (2014).
 3. Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, Miyagawa I, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka R, Yamamoto N, Nakae H, Kawase M, Gemma N, Sekiguchi Y, **Fujibuchi W**, Matoba R. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms, *Analytical Biochemistry*, 472: 75-83 (2015).

曾根秀子：研究分担者

1. Goodson III WH et al (**Sone H**, 54 of 139). Assessing the Carcinogenic Potential of Low Dose Exposures to Chemical Mixtures in the Environment: The Challenge. *Carcinogenesis*, 2015, in press.
2. Win-Shwe TT, **Sone H**, Kurokawa Y, Zeng Y, Zeng Q, Nitta H, Hirano S. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicol Lett.*, 228(3):207-215, 2014.
3. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, **Sone H**. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian *Esr1* expression in female mice. *Toxicol Lett.*, 228(3):235-240, 2014.
4. Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, **Sone H**, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. *Cytotechnology*. 67(2):191-197, 2015.
4. 加藤有己、桜井都衣、**藤淵航**. 「ヒト細胞からのビッグデータの情報管理と情報解析技術」ビッグデータの収集、調査、分析と活用事例 pp.249-254 (2014)。(書籍)
5. **藤淵航**. 「iPS細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用」、生命のビッグデータ利用の最前線、176-184 (2014)。(書籍)

2. 学会発表

各研究分担報告書に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西 聡、赤沼宏美、宮崎 航. 「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」特願 2009-81497, (2009).
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

藤淵 航：研究分担者

1. 山根順子、丸山徹、**藤淵航**、単細胞技術に基づく

分担研究報告書

ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

研究分担者

曾根秀子

国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長

研究要旨

昨年度に引き続き、ハイスループットアッセイ構築のため、ヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞 (hPNC) を用いて、ドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター発現ベクター pBluescriptIISK(+)-TH-metluc-Neo-copGF 及び pBluescriptIISK(+)-TH-pEGFP を導入した細胞の増殖および単離を試みた。また、平行して hPNC の三次元培養によるニューロスフィアを形成させ、ハイスループットアッセイに最適化した短期ニューロスフィアアッセイの条件を検討した。影響評価の検討には、Benzo[a]pyrene (BaP) 及び 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) の 2 種類の化学物質を使用し、用量反応関係を調べた。その結果、10 日間で終了し、多検体も同時に可能なアッセイ条件を見出し、化学物質の影響を定量的に把握することができるニューロスフィアアッセイを確立した。

A. 研究目的

本分担研究では、ヒト多能性幹細胞由来の神経前駆細胞を活用して、従来の遺伝子改変技術並びに TALEN を用いたゲノム編集でハイスループットイメージング用に加工し、複数のドナー株ならびに系統株を同一線上に配置した曝露試験を行うことを目的に、株化細胞の構築とアッセイ法の確立を行った。期待される効果は、ヒト神経前駆細胞の三次元培養による中枢神経の発達過程を模倣できる点と、毒性が懸念される化学物質のヒトへの影響を発生細胞レベルでスクリーニングできる点にある。これら 2 点の期待される成果は、将来的には大量の化学物質の安全基準に関わる初期スクリーニング試験を実施出来る可能性を持っている。公的研究施設に多能性幹細胞試験センターを設け情報を公開していく場合、重要なことは一試験の単価を極力抑えるべきで、今回提案する新規マーカーの選択や形態指標、バイオインフォマティクスによる影響予測の有

効性の検討はそのために重要である。また、我々の実施している研究プロトコルは ECVAM や JCVAM テストガイドラインへ提案できるような標準プロトコルの作成も視野に入れる。特にヒト細胞への影響という点で化学物質リスク事業のみならず創薬分野にも貢献できると思われる。

(倫理面への配慮)

平成 26 年度に使用したヒト胚性幹細胞 (H9 細胞) 由来神経前駆細胞株は、分化細胞であり、生命倫理的問題のない細胞である。

B. 研究方法

本研究で使用したヒト胚性幹細胞 (H9 細胞) 由来神経前駆細胞株は、米 EMD Millipore 社から購入した。

1) 神経系細胞分化マーカーの遺伝子導入

ヒト MAP2 遺伝子調節領域として報告されている hMAP2 ゲノム DNA の-1854 から+369 を組み込んだ pGL3-Metluc-copGFP-Neo プラスミド（Metluc は分泌型ルシフェラーゼで copGFP はカイアシ由来の GFP であり、2A ペプチド配列を挟んであるため単一プロモーターで同時発現解析できる）をエレクトロポレーションで遺伝子導入、hMAP2-Metluc-copGFP-hNPC 細胞（平成 24 年度作成）の増殖及び分化培養を行った。また、ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域（hsTH-T01）を組み込んだ pBluescriptIIISK (+) TH-pEGFP プラスミドを導入した hsTH-pEGFP-hNPC 細胞（平成 25 年度作成）の増殖・分化培養を行った。

2) ニューロスフィアアッセイに関する検討

hNPC 細胞を常法に従って培養し、ニューロスフィアアッセイに必要な量を増殖培養後、丸底 96 ウェルプレート（Nunc-Falcon）の 1 ウェルあたり、3000~6000 個細胞になるように、5~7 日間播種し、その後、平面底の 24 ウェルプレートもしくは 48 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 1 個のスフィアになるように播種し、神経分化専用培地で 5~7 日間さらに培養した。その後、4%PFA で固定、核は、ヘキストないし Celltracker で染色、神経は 1 次抗体が抗 MAP2 抗体、Alexa488 修飾二次抗体で染色し、マルチチャンネル自動画像解析装置（INCell-Analyzer 1000）により、神経突起伸長を定量化した。さらに、スフィア自体の大きさを測定するために、対物レンズ 4 倍率でスフィア全体を撮影（オリンパス社製）して画像を取得後、Image J でスフィアの面積を定量した。また、アッセイの評価のため、Benzo[a]pyrene (BaP) 及び 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) (Sigma) を最終濃度 0.1%DMSO に溶解して、細胞培養の培地中に添加した。

C. 研究結果

1) 神経系細胞分化マーカーの遺伝子導入

hMAP2-Metluc-copGFP-hNPC 細胞の増殖及び分化培養を行ったが、神経分化の様子を MAP2 抗体

による蛍光免疫化学染色で観察することは出来るものの、copGFP 蛍光は非常に微弱でアッセイに十分な蛍光強度は得られなかった。また、hsTH-pEGFP-hNPC 細胞の増殖・分化培養を行った。神経分化の様子を TH 特異抗体による蛍光免疫化学染色で行ったところ、EGFP の蛍光が TH とマージすることが確認できた。しかし、EGFP 蛍光は分化とともに減少し非常に微弱でアッセイに十分な蛍光強度は得られなかった。

2) ニューロスフィアアッセイに関する検討

ハイスループットアッセイに最適化したニューロスフィアアッセイの確立のために、1) 薄くて丈夫なマトリックスの検討、2) ニューロスフィアに最適な 1 ウェルあたりの細胞数、3) スフィア形成と分化期間の長さに関する 3 点の基礎検討を行った。1) 薄くて丈夫な細胞外マトリックスの検討では、我々の先行研究において二次元の培養ではあるが、ラミニン 511 (LN511) が従来のポリオルニチン-ラミニン 111 (PL-O-LN111) より神経分化が適当であることを見出し、これを使用してきたが、3 次元培養のスフィアアッセイにおいても同様であるかどうかを 4 種の細胞外マトリックス蛋白質のコートプレートを作成して検討した（図 1）。その結果、LN511 が含有されているコートプレートでは、十分に神経突起が伸展し、更に、固定→洗浄→免疫染色という多段階の行程を経ても型崩れしなかった。しかし、細胞あたりの神経突起伸長とスフィアコアから外側への遊走はポリオルニチン-ラミニン 111+ラミニン 511 (PL-O-LN111+511) が最も顕著であった（図 2）。2) ニューロスフィアに最適な 1 ウェルあたりの細胞数では、3000 個と 6000 個で検討したが、6000 個のほうが、再現性、均一性が高かった。3) スフィア形成と分化期間の長さに関する検討では、スフィア形成期間が長いほど、分化培地に移した後の細胞遊走能は高いことがわかったが、一方で細胞遊走能が高すぎると、解析のための細胞固定→免疫染色の行程には再現性が悪く、結果的にスフィア形成期間を 5 日間と、分化期間を 5 日間ないし 6 日間とする計 10-11 日間のアッセイ

を確立した。さらに、BaP 及び 5-Azadc のそれぞれ、3 用量をスフィア形成 2 日後に添加し 3 日間培養し、その後、化学物質のない分化培地で培養し、影響を調べた（図 3）。その結果、両物質とも、量依存的にスフィアコアからの神経細胞の遊走を抑制し、コアの増殖も抑制されることが観察された。

D. 考察

本研究では、ヒト神経細胞の分化を指標としたハイスループットアッセイを構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質である Map2 もしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子に緑色蛍光タンパク質 EGFP 遺伝子を結合したリポーター遺伝子を hPNC に組み込んだ。しかし、MAP2-リポーター遺伝子 hMAP2-metluc-Neo-copGFP 及び TH-pEGFP を組み込んだ安定株は樹立できない結果となった。ヒト多能性幹細胞は分化に時間がかかるため、検証するのに長期間を要する。また、マーカーとして選んだ遺伝子は、導入の報告がまだない遺伝子である。導入実績のある遺伝子に切り替える必要があると考えられるが、神経分化細胞では、未だ報告がない。今後もハイスループットに最適化した細胞を樹立するには、時間が必要と考えられた。

一方で、遺伝子改変のない素の hNPC を用いてニューロスフィアアッセイの確立を試みた。ハイスループット化には、再現性と定量性が求められる。そのため、1 ウェル 1 スフィアでアッセイすることを考案した。96 ウェルプレートでスフィアを作成し、ウェルの中心にスフィアを正着させて顕微鏡観察を行うためには、96 ウェルプレートよりも、48 ウェルプレートの方が再現性よく、中心部へのスフィア正着を起こさせることができ、また定量性もあるため、後者で化学物質の影響を評価した。しかし今後、ロボットアッセイ機器の導入が可能になれば、384 ウェルレベルまで解析が可能になるものと考えられた。

E. 結論

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性幹細胞由来神経分化細胞を構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質である Map2 の転写開始点より 1 kb 上流領域もしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子のエクソン 1 直後領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター発現ベクターを導入した遺伝子改変 hPNC の増殖・単離を試みたが、分化後に十分な強さの蛍光を持つ細胞は樹立できなかった。今後、更なる導入技術の改善やマーカー遺伝子の変更が必要と考えられた。また、非遺伝子改変 hNPC を用いた短期のニューロスフィアアッセイを確立し、化学物質曝露による評価を行い、アッセイの有用性を提示した。

F. 健康危険情報

特に記載する項目はない

G. 研究発表

1. Goodson III WH et al ([Sone H](#), 54 of 139). Assessing the Carcinogenic Potential of Low Dose Exposures to Chemical Mixtures in the Environment: The Challenge. *Carcinogenesis*, 2015, in press.
2. Win-Shwe TT, [Sone H](#), Kurokawa Y, Zeng Y, Zeng Q, Nitta H, Hirano S. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicol Lett.*, 228(3):207-215, 2014.
3. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, [Sone H](#). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicol Lett.*, 228(3):235-240, 2014.
4. Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, [Sone H](#), Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. *Cytotechnology*. 67(2):191-197, 2015.

2. 学会発表

1. 曾根秀子、村山典恵、王文龍、南齋ひろ子、曾勤、山崎浩史. ヒト肝細胞 HepaRG における環境化学物質の細胞毒性と薬物代謝酵素誘導能について. 環境フォーラム 2014、11 月つくば
2. Wenlong WANG, Qin ZENG, Hiroko NANSAI, Kuniya ABE, Hideko SONE. Detection of epigenetic effects induced by environmental chemicals in mouse ES cells harboring GFP-MBD-Ins. 環境フォーラム 2014、11 月つくば
3. 曾根秀子、曾洋、南齋ひろ子. ベイジアンネットワーク解析によるナノマテリアルの毒性予測に関する研究. 第 3 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2014) 2014 10 月 仙台
4. 曾根秀子. 化学物質による健康影響を予測する統合システム HEALS の紹介. アカデミックフォーラム 2014 東京
5. 曾根秀子. ベイジアンネットワーク解析による毒性影響の予測. 第 1 回「計算毒性学」研究会, 2014、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西 聡、赤沼宏美、宮崎 航. 「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」特願 2009-81497, (2009～出願・審査中).

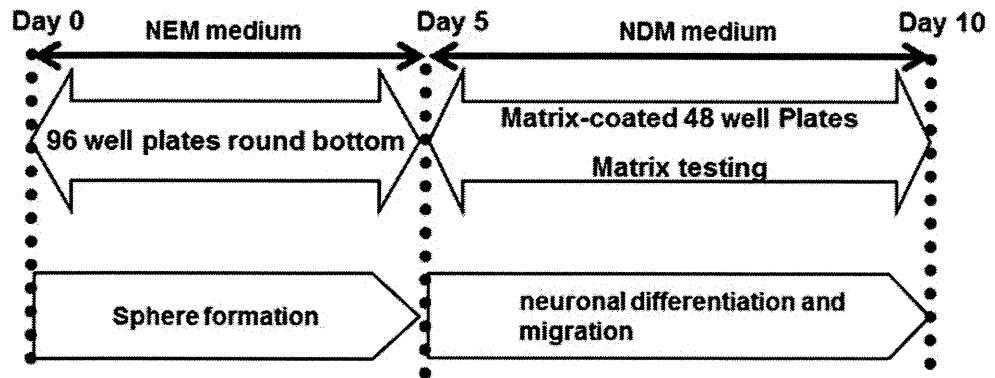
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

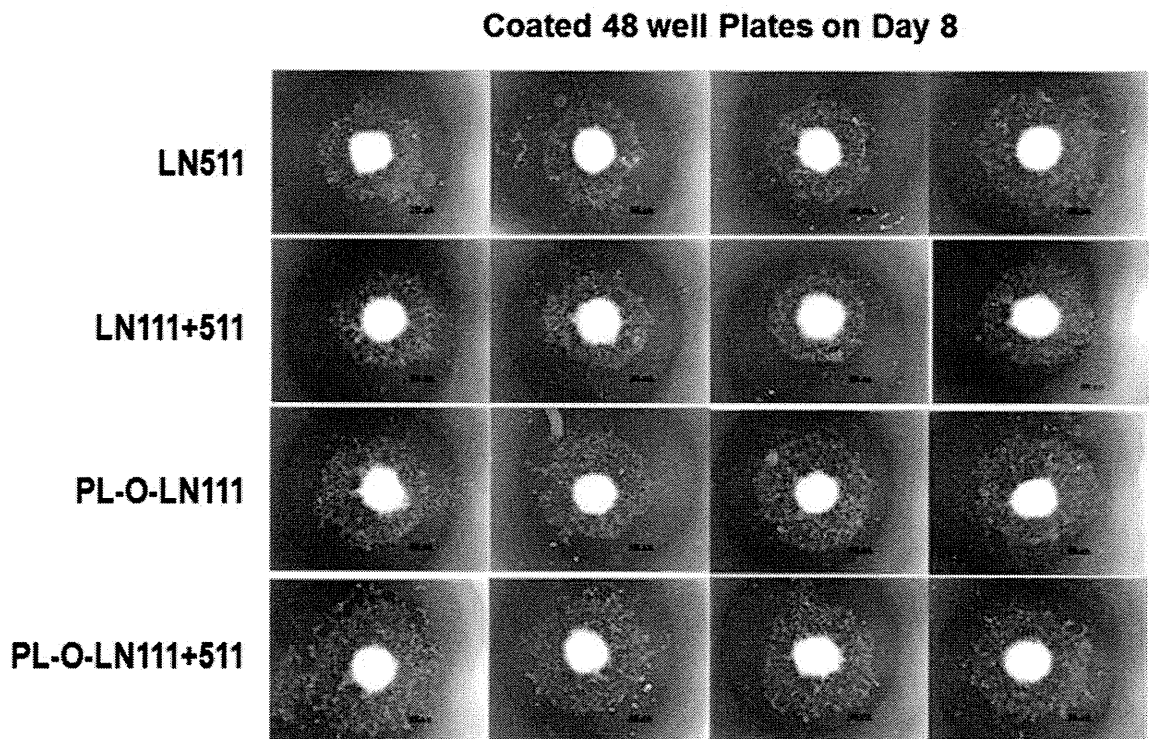


図 1. ヒト神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイプロトコル(A)及び最適な細胞外マトリックスの検討(B)
LN511, laminin511; LN111+511, laminin111 + laminin511, PL-O-LN111, Poly-L-Ornithine/laminin111; PL-O-LN111+511, Poly-L-Ornithine/laminin111+laminin511

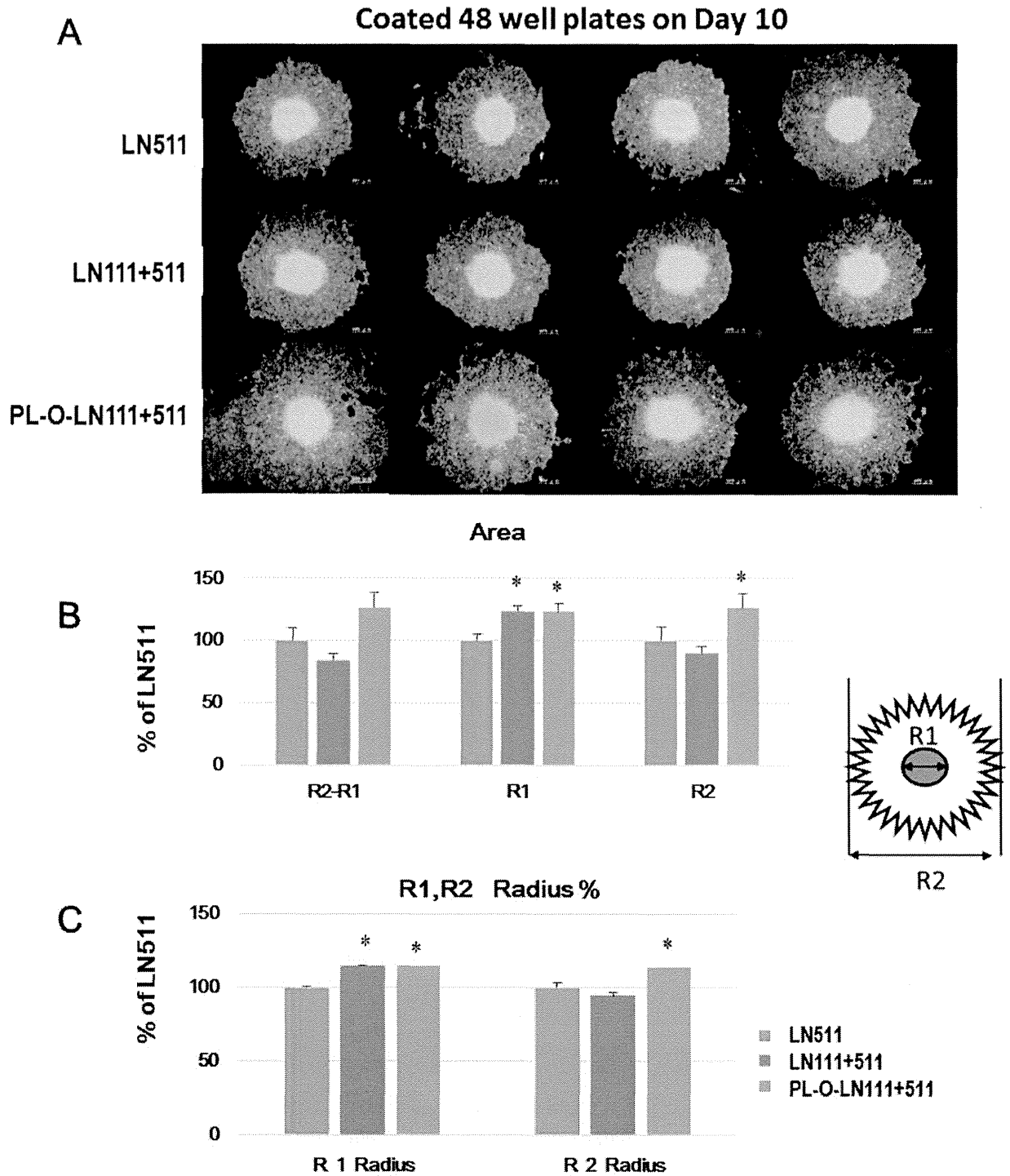
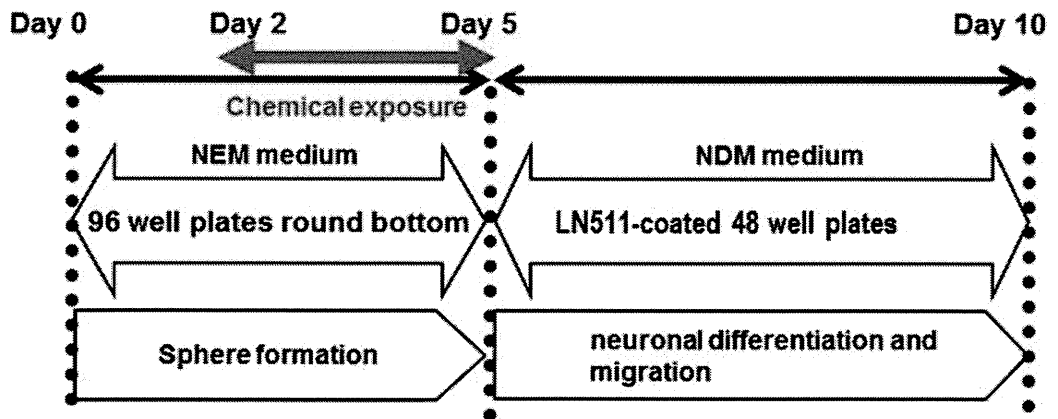


図2. 最適な細胞外マトリックスの検討

(A) 各種細胞外マトリックスにおける分化後のニューロスフィアの形態。(B) ニューロスフィアの面積定量 (n=4)、LN511 からの有意差 (*, $P < 0.05$)。 (C) ニューロスフィアの半径定量 (n=4)、LN511 からの有意差 (*, $P < 0.05$)。

A



B

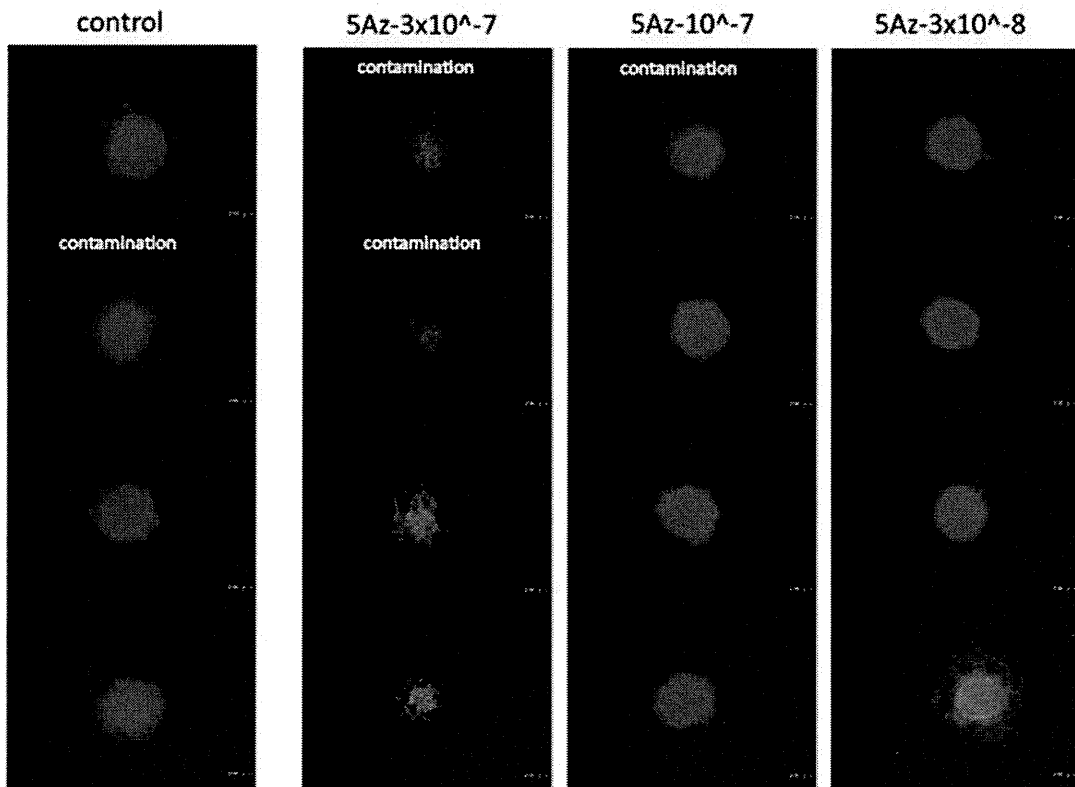


図 3. 化学物質曝露によるニューロスフィアアッセイの評価

(A) 化学物質曝露の時期とアッセイスケジュール。(B) 5-Azadc の曝露によるニューロスフィアの変化。

TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

研究分担者

大迫誠一郎

東京大学 疾患生命工学センター 准教授

研究要旨

本サブテーマではヒト ES 細胞に Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いたゲノム編集手法により、TH 遺伝子のエクソン 1 下流に EGFP を挿入した細胞を作成することを試みた。本実験は昨年度の国立環境研グループが実施した神経前駆細胞 (hPNC) への導入を実際にヒト ES 細胞で行えるかトライアルしたものである。ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域 (hs_TH_T01) を特異的に切断する TALEN 右側ベクターと左側ベクターを Sigma 社で作成した。また、TALEN による hs_TH_T01 領域の切断の際に、切断領域と相補的配列を両端に持つ 5' TH-EGFP-neo-3' を作成した。KhES1 にリポフェクションによる導入後、G418 によるセレクションを行い、10 日目に生存しているコロニーをピックアップしてクローン化しゲノム DNA を抽出した。PCR による TH 遺伝子への編集をチェックしたが、目的のサイズに PCR 産物が確認できるものの、陰性対象である野生型 KhES1 にも同様なバンドが確認されたことから、ゲノム編集は期待通りに起きていないことがわかった。

A. 研究目的

本分担研究では、ヒト多能性幹細胞から分化する神経系細胞のうちドーパミンニューロンの発生率とその形態をライブイメージング出来るよう遺伝子を加工したヒト ES 細胞を作成することを目的に実験を行った。従来の遺伝子改変技術並びに TALEN を用いたゲノム編集でハイスループットイメージング用に加工することを試みた。多能性幹細胞試験では一試験の単価を極力抑えるべきで、今回提案する新規マーカーの選択や形態指標、バイオインフォマティクスによる影響予測の有効性の検討はそのために重要である。また、我々の実施している研究プロトコルは ECVAM や JCVAM テストガイドラインへ提案できるような標準プロトコルの作成も視野に入れる。特にヒト細胞への影響という

点で化学物質リスク事業のみならず創薬分野にも貢献できると思われる。

B. 研究方法

Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域 (hs_TH_T01) を特異的に切断する TALEN 右側ベクター PTAL-R (pTAL-CMVn-021157) と左側ベクター PTAL-L (pTAL-CMVn-020432)、並びに TALEN による切断領域と相補的配列を両端に持つ DNA 断片 5' arm-pEGFP-3' arm を組み込んだ pBluescriptIISK(+)TH-pEGFP プラスミドは国立環境研究所曾根秀子博士より提供された (平成 25 年度総括・分担研究報告書)。

PTAL-R および PTAL-L は予め mMACHINE[®] T7 ULTRA Transcription Kit (Ambion 社) によって mRNA に変換し、ドナーベクターを組み込んだ pBluescriptIISK(+)TH-pEGFP プラスミド